

- [1] Übersicht: A. R. Battersby, E. McDonald in K. M. Smith: Porphyrins and Metalloporphyrins. Elsevier, Amsterdam 1975, S. 61.
- [2] A. R. Battersby, G. L. Hodgson, E. Hunt, E. McDonald, J. Saunders, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1, 1976, 273.
- [3] A. R. Battersby, E. McDonald, D. C. Williams, H. K. W. Würziger, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1977, 113; A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, E. McDonald, M. J. Meegan, *ibid.* 1978, 185; H. O. Dauner, G. Gunzer, I. Heger, G. Müller, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 147 (1976).
- [4] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 539; P. Jordan, J. S. Seehra, FEBS Lett. 104, 364 (1979).
- [5] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, K. E. Gustafson-Potter, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 316; A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, K. E. Gustafson-Potter, G. W. J. Matcham, E. McDonald, *ibid.* 1979, 1155.
- [6] A. R. Battersby, R. G. Brereton, C. J. R. Fookes, E. McDonald, G. W. J. Matcham, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1980, 1124.
- [7] Das von Desaminase gebildete Zwischenprodukt wurde unabhängig auch in Texas gefunden, ebenso, daß es ein Substrat für Cosynthetase ist (siehe G. Burton, P. E. Fagerness, S. Hosozawa, P. M. Jordan, A. I. Scott, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1979, 202). Es wurde jedoch fälschlich als *N*-Alkylpyrrol-Makrocyclus angesehen (siehe G. Burton, H. Nordlöv, S. Hosozawa, H. Matsumoto, P. M. Jordan, P. E. Fagerness, L. M. Pryde, A. I. Scott, J. Am. Chem. Soc. 101, 3114 (1979)).
- [8] Prinzipiell könnte Uroporphyrinogen-IV auch aus (7) durch Inversion von Ring B hervorgegangen sein; dies erscheint jedoch unter Berücksichtigung der Gesamtheit aller Resultate sehr unwahrscheinlich.
- [9] A. R. Battersby, C. J. R. Fookes, G. W. J. Matcham, E. McDonald, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1978, 1064.

## „Chemische Mutation“ durch Aminosäureaustausch im reaktiven Zentrum eines Proteinase-Inhibitors und Änderung seiner Hemmspezifität<sup>[\*\*]</sup>

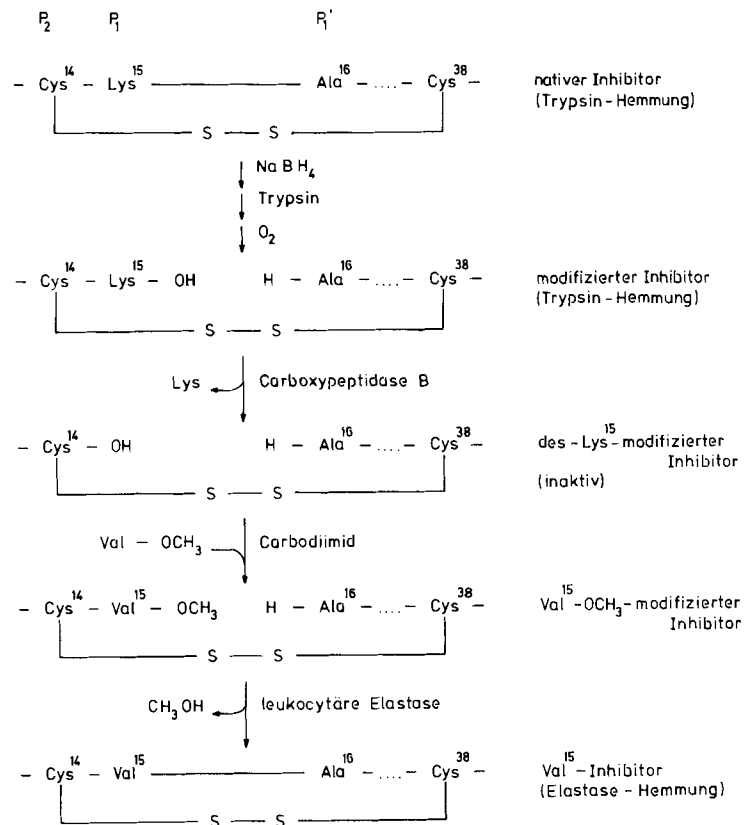
Von Herbert R. Wenzel und Harald Tschesche<sup>[\*]</sup>

Professor Gerhard Pfeleiderer zum 60. Geburtstag gewidmet

Niedermolekulare Proteinase-Inhibitoren hemmen Serin-Proteinasen durch reversible, substratanaloge Einlagerung in das aktive Zentrum der Enzyme<sup>[2]</sup>. Die Spezifität eines Inhibitors wird durch die Geometrie der Aminosäurereste an der Kontaktfläche festgelegt und meistens von der Aminosäure im reaktiven Zentrum P<sub>1</sub><sup>[3a]</sup>, bestimmt<sup>[3b]</sup>. Dies ist durch Sequenzvergleiche homologer Inhibitoren<sup>[4a]</sup> und in zwei Fällen durch semisynthetische Aminosäureaustausche<sup>[4b]</sup> belegt: So ließen sich durch enzymatische Reaktionen im Sojabohnen-Inhibitor (Kunitz) P<sub>1</sub> = Arg gegen Lys und im Inhibitor (Kunitz) aus Rinderorganen P<sub>1</sub> = Lys gegen Arg austauschen. Die anti-tryptische Aktivität beider Proteine blieb dabei erhalten. Ersatz der basischen Aminosäure durch Trp wandelte die beiden Inhibitoren mit primärer Spezifität gegen Trypsin in Inhibitoren mit primärer Spezifität gegen Chymotrypsin um. Die „enzymatische Mutation“ gelang bisher nur bei basischen und aromatischen Aminosäuren, da für andere Aminosäuren keine geeigneten Enzymsysteme gefunden werden konnten.

Wir beschreiben hier eine Methode, die auf rein peptid-chemischem Wege den Einbau fast jeder Aminosäure in die Position P<sub>1</sub> des Inhibitors (Kunitz) aus Rinderorganen ermöglicht. Der natürliche Inhibitor (P<sub>1</sub> = Lys<sup>15</sup>) hemmt Trypsin äußerst stark, Chymotrypsin stark, leukocytäre Elastase

kaum und Pankreas-Elastase überhaupt nicht. (Eine Projektion der α-Kohlenstoffatome des Inhibitors<sup>[5]</sup> ist in <sup>[2b]</sup>, Abb. 11, dargestellt.)



Schema 1. Austausch von Lys<sup>15</sup> gegen Val in der Position P<sub>1</sub> des Inhibitors (Kunitz) aus Rinderorganen.

Im nativen Inhibitor wird nach erprobten Verfahren die Lys<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup>-Bindung im reaktiven Zentrum geöffnet; mit Carboxypeptidase B erhält man dann den inaktiven des-Lys<sup>15</sup>-modifizierten Inhibitor<sup>[6]</sup>. Wasserlösliche Carbodiimide ermöglichen eine Verknüpfung von Val-OMe mit der freien Carboxygruppe von Cys<sup>14</sup><sup>[7]</sup> (Schema 1).

Das Produkt ist ein sehr guter Inhibitor für Elastase aus menschlichen Leukocyten. Die maximale Hemmung wird erst nach mehreren Minuten erreicht; der Komplex zwischen Elastase und Val<sup>15</sup>-Inhibitor bildet sich nur langsam. Wird dieser Komplex durch drastische pH-Erniedrigung dissoziiert (kinetisch kontrollierte Dissoziation), so erhält man einen Inhibitor, der Elastase sofort maximal hemmt. Dies spricht für die Knüpfung der Peptidbindung Val<sup>15</sup>-Ala<sup>16</sup> durch die Proteinase während der Komplexbildung<sup>[8]</sup>.

Die Semisynthese wurde nach dem gleichen Schema bisher außerdem mit den Methylestern von Arg, Phe, Met, Leu, Ala und Gly durchgeführt. Nach Aminosäure-Analyse wurden etwa 2.2 bis 4.1 Aminosäurereste pro Inhibitormolekül eingebaut, davon bis zu 0.3 in die entscheidende Position P<sub>1</sub>. Der weitere Anteil wurde an die fünf schon im unmodifizierten Inhibitor vorhandenen Carboxygruppen (Asp<sup>3</sup>, Glu<sup>7</sup>, Glu<sup>49</sup>, Asp<sup>50</sup>, Ala<sup>58</sup>) gekoppelt. Diese sind vom reaktiven Zentrum so weit entfernt, so daß ihre Derivatisierung auf die Inhibitoraktivität kaum Einfluß hat.

Die Hemmspezifität der neuen semisynthetischen Inhibitoren ließ sich aus dem Rest in P<sub>1</sub> und der bekannten Spaltungsspezifität der einzelnen Proteinasen weitgehend vorhersagen: Die Insertion von Arg stellt die ursprüngliche anti-tryptische Aktivität wieder her. Einführung von Phe oder Met führt zu starken Chymotrypsin-Inhibitoren, die auch

[\*] Prof. Dr. H. Tschesche, Dr. H. R. Wenzel  
Fakultät für Chemie, Lehrstuhl Biochemie der Universität  
Postfach 8640, 4800 Bielefeld 1

[\*\*] Zum Teil vorgetragen auf der Frühjahrstagung der Gesellschaft für Biologische Chemie, Münster, März 1980 [1]. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der Stiftung Volkswagenwerk und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Wir danken der Bayer AG für Trasylol® [Trypsin-Kallikrein-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderlunge].

Trypsin noch schwach hemmen. Darüber hinaus hemmt der Met<sup>15</sup>-Inhibitor auch schwach die Elastasen aus Schweinepankreas und menschlichen Leukocyten. Einen starken Inhibitor gegen beide Elastasen und Chymotrypsin erhält man durch den Einbau von Leu, Trypsin wird dann nur schwach gehemmt. Spezifischer scheint der Val<sup>15</sup>-Inhibitor zu sein, der starke Aktivität gegen menschliche Leukocyten-Elastase und schwache gegen Trypsin, Chymotrypsin und Schweinepankreas-Elastase zeigt. Alle vier Enzyme werden durch den Ala<sup>15</sup>-Inhibitor nur schwach gehemmt. Überraschenderweise zeigt der Gly<sup>15</sup>-Inhibitor keine Elastase-, aber gute Chymotrypsin- und ausgezeichnete Trypsin-Hemmung.

Die peptidchemische Methode ist eine wesentliche Erweiterung der Methoden zur Semisynthese von Proteinase-Inhibitoren, die neue Möglichkeiten eröffnet, die Zusammenhänge zwischen Sequenz und Reaktivität dieser Proteine zu untersuchen.

#### Arbeitsvorschrift

Eine Lösung von 100 mg modifiziertem des-Lys<sup>15</sup>-Inhibitor (Kunitz) aus Rinderorganen<sup>[6]</sup>, 20 mmol Aminosäuremethylester-hydrochlorid, 200 mg *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid und 400 mg *N*-Cyclohexyl-*N'*-(2-morpholinoethyl)carbodiimid-methyl-*p*-toluolsulfonat in 20 cm<sup>3</sup> Wasser läßt man im Autotitrator bei konstantem pH = 4.75 (Zugabe von 0.5 M Salzsäure) unter Rühren reagieren<sup>[7]</sup>. Nach der Reaktion wird der Inhibitor durch Gelfiltration an Sephadex G-25 fine (Elutionsmittel 0.1 M Essigsäure) von niedermolekularen Substanzen und höhermolekularen Proteinaggregaten abgetrennt.

Eingegangen am 25. September 1980 [Z 709]

- [1] H. R. Wenzel, H. Tschesche, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 345 (1980).
- [2] a) M. Laskowski, Jr., R. W. Sealock in P. D. Boyer: The Enzymes. Vol. III, Academic Press, New York 1971, S. 375; b) H. Tschesche, Angew. Chem. 86, 21 (1974); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 13, 10 (1974).
- [3] a) I. Schechter, A. Berger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 157 (1967); b) M. Laskowski, Jr., Biochem. Pharmacol., im Druck.
- [4] a) M. Laskowski, Jr., I. Kato, Annu. Rev. Biochem. 49, 593 (1980); b) R. W. Sealock, M. Laskowski, Jr., Biochemistry 8, 3703 (1969); H. Jering, H. Tschesche, Eur. J. Biochem. 61, 453 (1976).
- [5] R. Huber, D. Kukla, A. Rühlmann, O. Epp, H. Formanek, Naturwissenschaften 57, 389 (1970).
- [6] H. Jering, H. Tschesche, Eur. J. Biochem. 61, 443 (1976).
- [7] G. E. Means, R. E. Feeney: Chemical Modification of Proteins. Holden-Day, San Francisco 1971.
- [8] U. Quast, J. Engel, E. Steffen, H. Tschesche, S. Kupfer, Biochemistry 17, 1675 (1978).

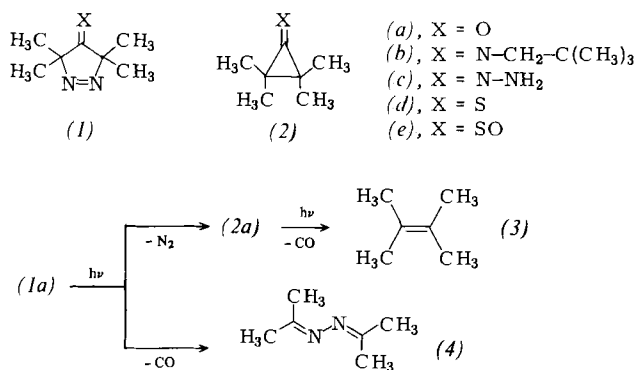
### Tetramethylcyclopropanon und Isopropyliden(dimethyl)thiiran durch Photolyse reaktionsträger 3,3,5,5-Tetramethyl-1-pyrazoline; Solvens- und Temperatureinfluß auf die Konkurrenz von [3 + 2]- und [4 + 1]-Photocycloeliminierung<sup>[\*\*]</sup>

Von Helmut Quast und Andreas Fuß<sup>[\*]</sup>

Professor Alfred Roedig zum 70. Geburtstag gewidmet

Die Photolyse von 1-Pyrazolinen vom Typ (1) mit einer exocyclischen Doppelbindung an C-4 birgt zahlreiche Überraschungen<sup>[1]</sup>. So erhielten wir kürzlich durch Photolyse des

Pyrazolinimins (1b) das Cyclopropanimin (2b), aber erst bei 90 °C<sup>[2]</sup>. Diese unerwartete Temperaturabhängigkeit der Photoextrusion von N<sub>2</sub> aus (1b) veranlaßte uns, die Reaktionsträgheit des 1-Pyrazolinons (1a)<sup>[3a]</sup> ( $\Phi_{313} = 0.012$  in Benzol bei 25 °C<sup>[3b]</sup>) bezüglich thermischer und photochemischer Stickstoffabspaltung erneut zu prüfen. Weiterhin könnte beim 1-Pyrazolinthion (1d) die Photolyse bei tiefer Temperatur das noch unbekannte Cyclopropanthion (2d) ergeben. Die thermische Erzeugung reaktiver C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>S-Spezies aus anderen Vorstufen führte bisher stets zu Methylenthiiranen<sup>[4]</sup>, die ca. 30 kJ/mol stabiler sein sollen als Cyclopropanthione<sup>[4d]</sup>.



Angesichts der niedrigen Quantenausbeute der 313 nm-Photolyse von (1a) und der ähnlichen n,π\*-Absorptionen von (1a)<sup>[11]</sup> und Cyclopropanonen<sup>[5]</sup> ist eine selektive Bestrahlung von (1a) ohne Anregung des Cyclopropanon-Produkts schwierig. Daher wurde (1a) mit einer starken Lichtquelle ohne Filter bestrahlt<sup>[6a,b]</sup>. Wir erhielten 2,3-Dimethylbuten (3) und Acetonazin (4) (Tabelle 1) sowie in [D<sub>3</sub>]Acetonitril noch 1–3% Pyrazolidinon (6) durch Photoreduktion von (1a) (<sup>1</sup>H-NMR, GC, IR).

Tabelle 1. <sup>1</sup>H-NMR-spektroskopisch bestimmter Umsatz und Produktverhältnis (3):(4) bei der Photolyse [6a, b] des 1-Pyrazolinons (1a).

Lösungsmittel	T [°C]	t [min]	Umsatz [%]	Verhältnis (3):(4)
[D <sub>12</sub> ]Cyclohexan	10	60	52	63:37
	90	30	67	57:43
[D <sub>6</sub> ]Benzol	10	60	37	78:22
	90	30	63	64:36
[D <sub>3</sub> ]Acetonitril	10	60	27	83:17
	90	30	55	68:32

2,3-Dimethylbuten (3) könnte durch Photodecarbonylierung von (2a) entstanden sein<sup>[5]</sup>. Um dieses abzufangen, wurde (1a) in [D<sub>4</sub>]Methanol 1–6 h bei 5 °C bestrahlt<sup>[6a,c,d]</sup>. Bei 14–97% Umsatz erhielten wir nur 1% (3), 4–5% (4) und 6 bis 11% des erwarteten Folgeprodukts (5); Hauptprodukte waren 30–37% (6), 23–27% (8) und 26–29% (9). Da Cyclopropanone, insbesondere alkylierte, sehr leicht homolytisch gespalten<sup>[7]</sup> werden, reagiert (5) mit Triplett-angeregtem Benzophenon nahezu quantitativ zu 1,1,2,2-Tetraphenyl-1,2-ethandiol und den Estern (8) und (9). Diese entstehen durch Disproportionierung des Radikals (7)<sup>[7a]</sup>. Aufgrund der Bildung von (6), (8) und (9) in ungefähr gleichen Mengen wird auf die Existenz eines relativ langlebigen angeregten Zustands von (1a), sehr wahrscheinlich T<sub>1</sub>(1a), geschlossen, der Wasserstoff vom photostabilen<sup>[7a]</sup> Halbacetal (5) abstrahieren kann. Die photoelektronenspektroskopisch beobachtbare Wechselwirkung zwischen Azo- und Carbonylorbitalen in

[\*] Prof. Dr. H. Quast, Dipl.-Chem. A. Fuß  
Institut für Organische Chemie der Universität  
Am Hubland, D-8700 Würzburg

[\*\*] Photochemische Bildung von Methylcyclopropan-Analoga. 4. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Die Ergebnisse sind Teil der geplanten Dissertation von A. F. – 3. Mitteilung: [2].